

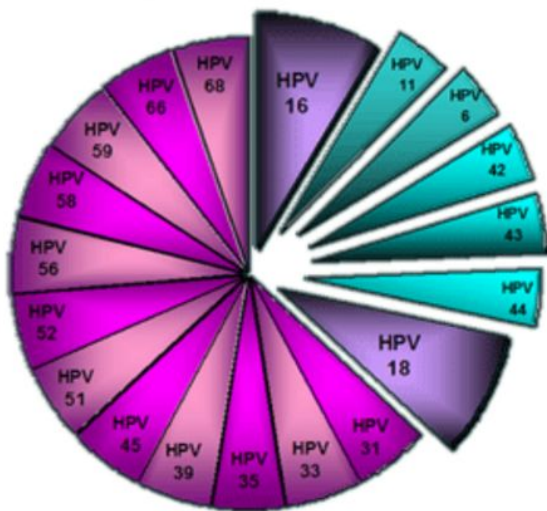
Corso STEM “Il papilloma virus” (Prof.ssa Gabriella Di Cola)



Cos'è il Papillomavirus?

Il papilloma virus (HPV) interessa maggiormente le donne intorno ai 25 anni di età; esso intacca la zona genitale, in particolare le cellule dell'epitelio squamoso ed è a trasmissione sessuale. Questo virus presenta un genoma circolare a doppia elica di DNA e altera il normale ciclo cellulare.

Tipi di papilloma virus



Esistono circa 100-200 tipi di questo virus, di cui 15 sono i più pericolosi e a rischio oncogeno. Essi si suddividono in:

- virus a basso rischio, per cui si verifica un'infezione episomiale e, quindi, il plasmide circolare regredisce
- virus a rischio medio-alto
- di elevata gravità
- carcinoma in situ, per cui il 16 e il 18 sono i più pericolosi; in questo caso, il DNA del virus entra nella cellula

Vaccini

Possono essere di due tipi:

- Gardasil → quadrivalente (valido per i tipi 16, 18, 6, 11 di HPV), somministrato in 3 dosi.
- Cervarix → bivalente (valido per i tipi 16 e 18 di HPV), somministrato in 3 dosi.



Sì, hai capito bene,
un Pap-test
può salvarti
la salute.



Prevenzione

Per prevenire il virus, inoltre, le donne possono sottoporsi al pap test, che rileva eventuali anomalie nel collo dell'utero, e all'HPV DNA, che individua direttamente il DNA del virus.

Relazione di laboratorio

Obiettivo: verificare se nel DNA della persona analizzata è presente una mutazione causata dal virus del papilloma.

Materiale: bastoncino, beker, pipette, provette, vasca elettroforetica.

Sostanze: NaCl, gel di agarosio, glicerolo, coloranti.

Procedimento



1. Estrazione del DNA dalla bocca: con un bastoncino prelevare delle cellule dalla bocca e mettere il tutto in una provetta.

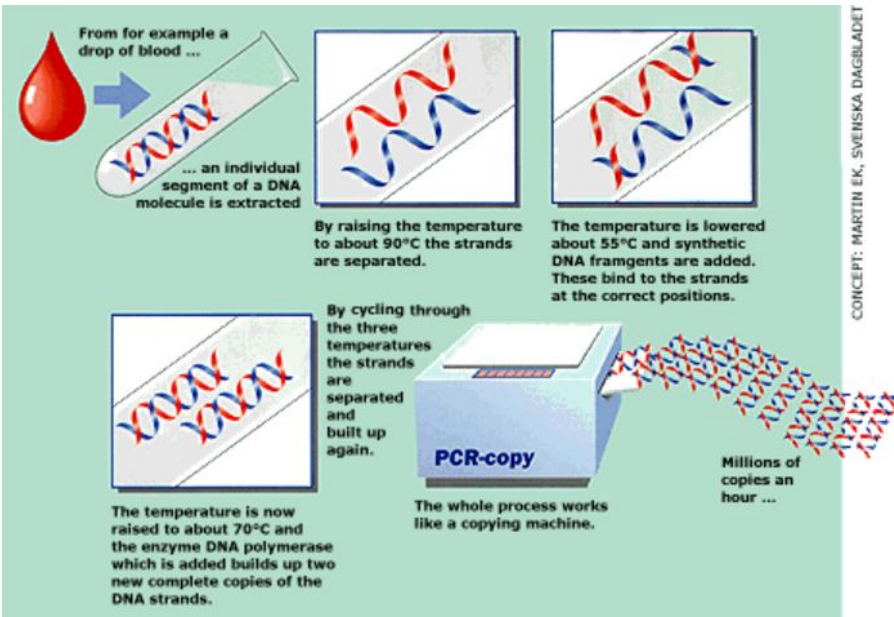


2. Isolare l'intera sequenza di DNA: mescolando la provetta, si nota che la soluzione si suddivide in pellet (detriti cellulari) e surnatante (DNA in soluzione).

A questo punto, aggiungere NaCl, per neutralizzare le cariche negative del DNA, ed etanolo assoluto per far precipitare il DNA; mescolare. Ora si può notare che il DNA si trova nel pellet e, quindi, si può eliminare il surnatante. Mescolare di nuovo e poi lasciare asciugare il pellet; in seguito l'alcol evapora. Sospendere il pellet in tampone e far agire l'enzima RNA-asi, che degrada l'RNA e rende il DNA più puro (DNA genomico).

3. Isolare e amplificare il gene (PCR):
- inneschi, che isolano e amplificano il gene

- nucleotidi, che sono i nuovi filamenti di DNA
- sali di magnesio per formare l'ambiente chimico ideale per l'enzima
- TAC-polimerasi, che amplifica il DNA
- acqua sterile



Mettere il tutto nel termociclatore, dove il DNA viene amplificato:

- denaturazione, a 95° C, per cui i filamenti di DNA si separano

- annealing, a 30° C, per cui gli inneschi si legano ad una specifica sequenza

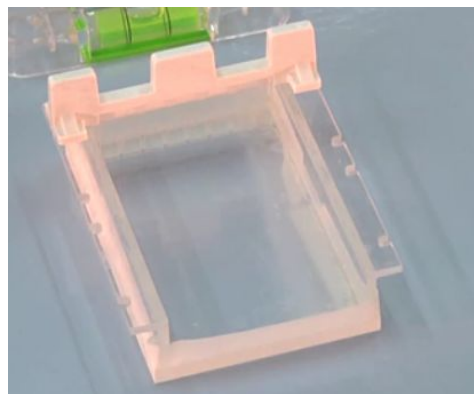
- sintesi del filamento complementare in direzione 5'-3', grazie all'enzima DNA-polimerasi

Questo ciclo si ripete fino a creare tantissime nuovi filamenti.

4. Preparazione del gel di agarosio:

agarosio all'1,5% p/v in un buffer di corsa TAE (legante)

- sciogliere la polvere di agarosio nella soluzione tampone e scaldare
- aggiungere acqua distillata per mantenere la concentrazione
- aggiungere colorante che in seguito si legherà al DNA in modo da renderlo visibile alla luce ultravioletta
- mettere il preparato nello stampo e fare raffreddare



5. Preparazione dei campioni amplificati:

i campioni vengono messi in evidenza attraverso l'utilizzo di coloranti, mentre il glicerolo permette che essi rimangano ben posizionati nei pozzetti della vasca elettroforetica.

6. Elettroforesi: posizionare i vari campioni all'interno dei pozzetti.

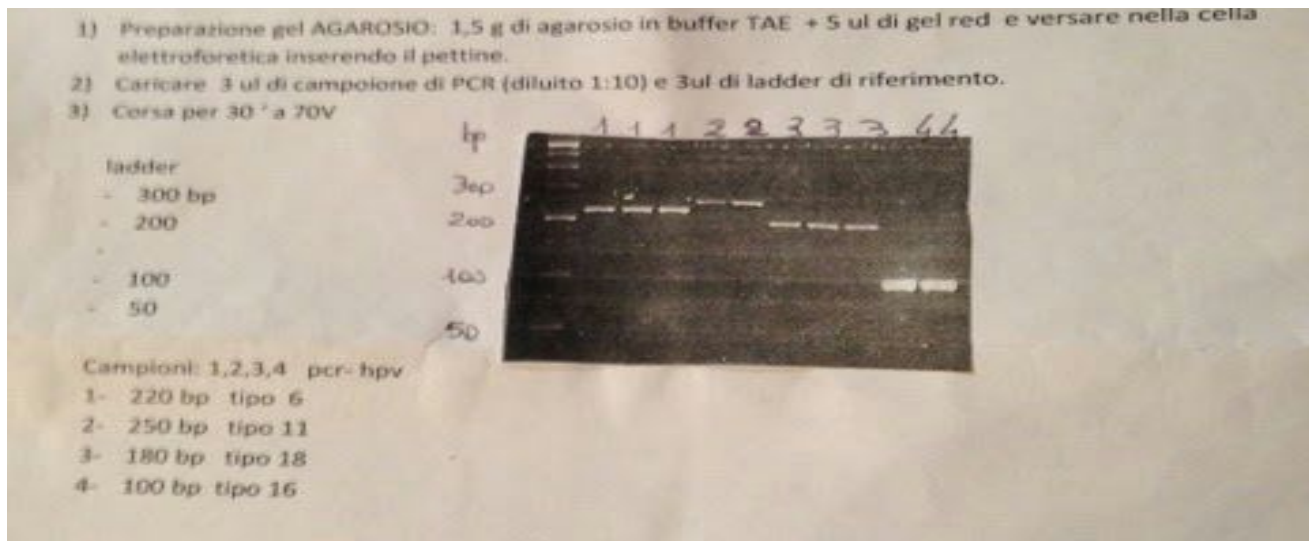


- Pozzetto 1: inserire un gene sano usato come controllo negativo

- Pozzetto 2: DNA campione 1;
- Pozzetto 3: DNA campione 2;
- Pozzetto 4: DNA campione 3;
- Pozzetto 5: DNA campione 4;

Collegare i morsetti alla camera di corsa e porre il campo elettrico a 80 Volt; non appena i campioni di DNA iniziano a migrare verso il polo positivo, aumentare il campo elettrico a 100 Volt. Il gel di agarosio su cui scorrono i campioni separa i frammenti in base al loro peso molecolare, per cui quelli più piccoli migreranno più velocemente di quelli più grandi.

Conclusione:



Attraverso il transilluminatore del gel si può notare che al termine della corsa elettroforetica vediamo a seconda del tipo di HPV dove le bande si sono fermate intendendo bp=base-pairs :

1. per il pozzetto 1 abbiamo 3 bande corrispondenti a 220 bp;
2. per il pozzetto 2 abbiamo 2 bande corrispondenti ai 250 bp;
3. per il pozzetto 3 abbiamo 3 bande corrispondenti a 180 bp;
4. per il pozzetto 4 abbiamo 2 bande corrispondenti a 100 bp;

Concludendo possiamo dire che ad ogni pozzetto corrisponda un tipo di papilloma virus differente:

- pozzetto 1 → soggetto affetto da papilloma di tipo 6
- pozzetto 2 → soggetto affetto da papilloma di tipo 11
- pozzetto 3 → soggetto affetto da papilloma di tipo 18
- pozzetto 4 → soggetto affetto da papilloma di tipo 16